

The Opposing Function of Leukocytes in Liver and Lung Metastases

Dissertation

zur

Erlangung der naturwissenschaftlichen Doktorwürde

(Dr. sc. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Universität Zürich

von

Darya Protsyuk

aus

der Ukraine

Promotionskommission

Prof. Dr. Anne Müller (Vorsitz)

Prof. Dr. Lubor Borsig (Leitung)

Prof. Dr. Thierry Hennet

Prof. Dr. Cornelia Halin Winter

Zürich, 2017

Table of contents

Table of contents.....	3
SUMMARY.....	5
ZUSAMMENFASSUNG	6
INTRODUCTION	10
1. Metastasis.....	10
1.1. Metastatic spread	10
1.1.1. Dissemination of tumor cells	10
1.1.2. Tumor cell survival in the blood and adhesion at secondary organs	11
1.1.3. Metastatic niche formation.....	13
1.1.4. Transendothelial migration of tumor cells	17
1.2. Tissue-specific metastasis	19
1.2.1. Organotropic dissemination of tumor cells	19
1.2.2. Liver metastasis.....	23
1.2.3. Lung metastasis.....	25
2. Leukocytes in metastatic niche	27
2.1. Introduction.....	27
2.2.1. Myeloid-derived suppressor cells	29
2.2.2. Neutrophils.....	30
2.2.3. Monocytes and macrophages	33
2.2.4. Summary	35
2.3. Contribution of lymphocytes in metastatic development.....	37
2.3.1. Cytotoxic lymphocytes and effector T cells.....	37
2.3.2. Gamma-delta T cells	39
3. Chemokines and chemokine receptors in metastatic niche	42
3.1. Organ-specific expression of chemokines in metastasis	42
3.2. Metastatic niche formation by chemokines.....	45
4. L-selectin contribution to cancer development	48
4.1. Structure of selectins and selectin ligands	48
4.2. L-selectin shedding	50
4.3. Role of L-selectin.....	51
4.4. L-selectin-induced signaling in leukocytes.....	53

TABLE OF CONTENTS

4.5. L-selectin in tumor progression	55
4.6. L-selectin-directed therapies	56
5. Scientific aim	59
6. References.....	60
Manuscript #1: The opposing role of myeloid cells in lung and liver metastatic progression.....	78
Manuscript #2: The chemokine CCL2 is a vascular permeability factor inducing endothelial retraction and facilitating lung metastasis.....	122
Manuscript #3: Metastatic growth progression caused by PSGL-1–mediated recruitment of monocytes to metastatic sites	156
DISCUSSION	179
1. Endogenous selectin ligands facilitate monocyte recruitment and promote pulmonary metastasis	179
2. Endothelial CCR2 enables pulmonary metastatic seeding.....	181
3. L-selectin in the pulmonary metastasis	181
4. Relevance of leukocytes and L-selectin in the permeability of liver endothelial cells	182
5. L-selectin deficiency leads to amended leukocyte composition in the liver	183
6. Contribution of L-selectin deficient Kupffer cells in liver metastasis	184
7. Contribution of L-selectin deficient $\gamma\delta$ T cells in liver metastasis.....	185
8. Increased neutrophil infiltration contributes to the tumor cell elimination.....	185
9. References.....	188
ACKNOWLEDGMENTS	193
CURRICULUM VITAE.....	196
APPENDIX.....	198
Manuscript #4: Monocyte induction of E-selectin–mediated endothelial activation releases VE-cadherin junctions to promote tumor cell extravasation in the metastasis cascade	198

SUMMARY

Metastasis is a step during cancer progression that is clinically challenging to determine and treat. The association of tumor cells with leukocytes influences successful tumor cell seeding and their survival in the metastatic niche. Selectins are vascular adhesion receptors that facilitate the recruitment of leukocytes to metastatic sites, and mediate interactions between tumor and stromal cells. Particularly the absence of L-selectin on leukocytes decreases the infiltration of immune cells in the lungs and reduces pulmonary metastasis. Our aim was to elucidate the contribution of L-selectin during metastatic development in lungs and liver.

While pulmonary metastasis was attenuated, liver metastasis was increased in L-selectin deficient mice. We determined that the selectin-dependent recruitment of inflammatory monocytes induced vascular permeability, promoted the extravasation of tumor cells and supported tumor cell survival in the lungs. The adoptive transfer of wild type bone marrow-derived monocytes into L-selectin deficient mice ameliorated metastatic development in the lungs.

In the liver, we observed increased amounts of Kupffer and $\gamma\delta$ T cells in the absence of L-selectin. These cells were also enriched in adult L-selectin deficient mice that were tumor-free, but their influence on metastatic development was shown to be limited. Furthermore, L-selectin facilitated the recruitment of neutrophils into the metastatic liver. We showed that liver neutrophils produce reactive oxygen species *in vivo*, and increased tumor cell apoptosis *in vitro*. Depleting neutrophils at later metastatic stages increased liver metastasis, confirming the cytotoxic function of neutrophils. Accordingly, the adoptive transfer of wild type neutrophils decreased liver metastasis in L-selectin deficient mice.

In summary, we identified an opposing role of L-selectin on metastatic development in the lungs and the liver. In the lungs, L-selectin mediates the recruitment of monocytes that promote tumor cell extravasation and support metastatic development. In the liver, L-selectin facilitates the recruitment of cytotoxic neutrophils that eliminate tumor cells and decrease metastasis. Our study demonstrated the contribution of myeloid cell populations to tissue-specific metastasis and defined a novel role of L-selectin during metastatic progression.

ZUSAMMENFASSUNG

Metastase ist ein Prozess, der während einer Krebserkrankung stattfindet, die schwer zu bestimmen und behandeln ist. Die Assoziierung von Tumorzellen mit Leukozyten beeinflusst die Verbreitung und das Überleben der Tumorzellen in der metastatischen Umgebung. Selektine sind vaskuläre Adhäsionsrezeptoren, welche die Rekrutierung von Leukozyten zu metastatischen Standorten vereinfachen, und Interaktionen zwischen Tumor- und Stromazellen unterstützen. Vor allem die Absenz von L-Selektin auf Leukozyten vermindert die Infiltration von Immunzellen in den Tumor und die Entwicklung pulmonaler Metastasen. Unser Ziel war es, den Beitrag von L-Selektin zur Metastase in den Lungen und in der Leber zu beschreiben.

In Mäusen ohne L-Selektin gab es weniger pulmonale Metastasen, während eine Zunahme von Metastasen in der Leber beobachtet werden konnte. Wir konnten zeigen, dass in den Lungen, die Selektin-abhängige Rekrutierung von inflammatorischen Monozyten zu einer Zunahme der vaskulären Permeabilität, einer vermehrten Infiltration von Tumorzellen aus der Blutbahn in das unterliegende Gewebe, und verbessertes Überleben der Tumorzellen geführt hat. Der Transfer von Knochenmark-abgeleiteten Monozyten einer wild typ Maus in die Lungen eines L-Selektin Mutanten, hat die metastatische Entwicklung in den Lungen wieder korrigiert.

In der Leber haben wir eine Zunahme an Kupffer und $\gamma\delta$ -T-Zellen in L-Selektin defizitären Mäusen beobachtet. Diese Zunahme war auch in L-Selektin-Mutanten zu beobachten, die nicht mit Tumoren belastet waren. Wir haben gezeigt, dass diese Zellpopulationen während der Metastase fast keine Rolle spielen. Wir konnten aber in vivo zeigen, dass neutrophile Granulozyten reaktive Sauerstoffspezies generieren und dass diese Zellen in vitro zu einer Zunahme der Apoptose in Tumorzellen führen. Wurden neutrophile Granulozyten während der späten Metastase dezimiert, konnten vermehrt Metastasen in der Leber beobachtet werden, welches die zytotoxische Rolle der neutrophilen Granulozyten bestätigt.

Zusammenfassend haben wir eine entgegengesetzte Rolle von L-Selektin auf die Metastase in den Lungen und der Leber feststellen können. In den Lungen bewirkt L-Selektin die Rekrutierung von Monozyten, welche die Einwanderung von Tumorzellen und damit die Entwicklung von Metastasen begünstigen. In der Leber fördert L-Selektin die Rekrutierung von zytotoxischen neutrophilen Granulozyten, welche Tumorzellen eliminieren und damit Metastasen vermindern. Unsere Studie demonstriert die Rolle der myeloiden Zellpopulationen während gewebespezifischer Metastase und definiert eine neue Rolle für L-Selektin während dem metastatischen Prozess.